Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. Hansjürgen Raettig

AUFNAHME UND VERTEILUNG VON RADIOMARKIERTEM ANTIGEN VON S. TYPHI MURIUM IN DER MAUS BEI ORALER, RECTALER UND SUBCUTANER ANWENDUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Meves
aus Dortmund

1966

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. Hansjürgen Raettig

AUFNAHME UND VERTEILUNG VON RADIOMARKIERTEM ANTIGEN VON S. TYPHI MURIUM IN DER MAUS BEI ORALER, RECTALER UND SUBCUTANER ANWENDUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Meves
aus Dortmund

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. Witt

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 18.11.1966

Einleitung

Im Jahre 1891 berichtete PAUL EHRLICH (1) als erster über Erfolge bei Versuchen mit oraler Immunisierung, und 1905 erreichte LOEFFLER (2) durch Verfütterung mit Impfstoff getränkter Brotwürfel eine Immunität gegen Salmonelleninfektionen. Dieses Experiment wurde später noch von mehreren Autoren unter verschiedenen Bedingungen wiederholt, zuletzt von RAETTIG (4) und ENGELHARDT (5) im Jahre 1961.
Wenn diese Immunisierungen an der Infektionsbelastung gemessen wurden, waren sie stets erfolgreich, nimmt man jedoch das Auftreten von Antikörpern als Kriterium des Impferfolges, so kann man höchstens von wechselnden Befunden sprechen.
Obwohl sich die Methode der oralen Immunisierung gegen Typhus bis 1958 in insgesamt 23 Feldversuchen bewährt hat (3), konnte sie sich noch nicht allgemein durchsetzen.
Der Grund war, daß nach der um diese Zeit in Deutschland verbreiteten Lehrmeinung von der humoralen Immunität (3) der Erfolg einer Immunisierung vorwiegend an den aus dem strömenden Blut nachweisbaren Antikörpern gemessen wurde, und nach der oralen Immunisierung gegen Typhus nicht mit Sicherheit Antikörper nachgewiesen werden konnten. Den Ausweg bot die Theorie von der lokalen Immunität von BESREDKA (6), einem Schüler von METSCHNIKOFF, der, wie übrigens schon WASSERMANN und CITRON (7) im Jahre 1905 postuliert hatten, eine lokale Immunität, also im Fall des Typhus eine Darm-Immunität, annahm. Dabei soll sich jede einzelne Zelle des Magen-Darm-Traktes, die mit dem Impfstoff in Berührung gekommen war, mit einem "speziellen Substrat" gegen die

nachfolgende Infektion schützen.In diesem Fall wäre gegen die Infektion des Magen-Darm-Kanals die orale Immunisierung tatsächlich die adäquate Methode. Mitteilungen von BRÜCKNER (8),LUMIERE (9),CHEVROTIER (10) und REITER (11),die nach oraler Immunisierung einen Impfschutz auch gegen parenterale (subcutane, intravenöse und intraperitoneale) Infektion fanden, sprechen dafür,daß das Antigen durch die Schleimhäute resorbiert wird und damit eine allgemeine Immunisierungsreaktion auslöst.Das bedeutet,daß auch nach oraler Applikation der Impfstoff auf dem Lymph- oder Blutweg zum RES gelangt,um von dort aus die Antikörpersynthese zu induzieren.Denn nach den Forschungen von EHRICH (12) und HAUROWITZ (13) sind bei der Synthese der humoralen Antikörper das RES und die Plasmazellen maßgeblich beteiligt.

Im Rahmen der in der epidemiologischen Abteilung des Robert Koch-Institutes Berlin laufenden Versuchsreihe über orale Immunisierungsmethoden (RAETTIG) war meine Aufgabe,festzustellen,ob und nach welcher Zeit enteral (oral und rectal) und als Kontrolle subcutan gegebenes Vollantigen von Salmonella typhi murium aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird und wie es im Mäuseorganismus verteilt wird.

Zur "Sichtbarmachung" wurde das Antigen mit dem Radionuklid J-131 bzw. P-32 markiert.

Material und Methoden

1.Versuchstiere

Für die Versuche wurden weisse Mäuse vom Stamm NMRI aus der Zucht des Robert Koch-Institutes Berlin verwendet.Die Tiere wurden im Digestorium des Isotopenlabors unter konstanten Umweltbedingungen gehalten. Die Auswahl für die Versuche nach Alter und Geschlecht geschah zufällig,um jede Einseitigkeit in der Zuteilung zu den einzelnen Versuchsreihen nach Möglichkeit zu vermeiden.Das Gewicht betrug im Durchschnitt 20 Gramm.

2.Impfstoff

Ich arbeitete mit dem im TPE-Labor des Robert Koch-Institutes gehaltenen Hauptstamm von Salmonella typhi murium.Für eine Versuchsreihe wurden davon 2 Ösen abgeimpft und in 10 ml Bouillon,deren pH-Wert auf 7,4 eingestellt war,gebracht.Nach Zugabe von 90 ml Sautonlösung wurden die Bakterien in einer Waschflasche unter Belüftung 3 Std bei 37°C bebrütet.Danach wurde die Bakteriensuspension zweimal in modifizierter Sautonlösung, die kein Phosphat enthielt,durch Zentrifugieren gewaschen, wonach sie jedesmal wieder in 100 ml modifizierter Sautonlösung aufgenommen wurde.Der Titer betrug zu diesem Zeitpunkt zwischen $8x10^8$ und $3x10^9$ Bakterien pro ml. Nun wurden zur Radiomarkierung zu dieser Bakterienaufschwemmung 2 mC P-32 als Orthophosphat in salzsaurer Lösung (Amersham,PBS 1) gegeben,und dann wurde weitere 3 Std bei 37°C wie oben bebrütet.Diese Kultur wurde 12 Std bei 4°C aufbewahrt und endlich in modifizierter Sautonlösung so oft gewaschen (im Durchschnitt dreimal), bis in der Waschflüssigkeit keine Aktivität mehr nachweisbar war,das heißt bis alles nicht von den Bakterien aufgenommene oder schon wieder ausgeschiedene P-32 entfernt war.

Bei den Vorversuchen hatte ich die Bakterien auch mit J-131 markiert. Doch hierbei konnte die Frage, inwieweit das Radionuklid nach der Applikation des Impfstoffes im Tierkörper vorzeitig abgebaut und ausgeschieden wird,nicht eindeutig geklärt werden. Deshalb verwendete ich für alle weiteren Versuche das P-32.Von diesem ist Genaueres über den Einbau in die Desoxy-und Ribonucleinsäure der Bakterien bekannt. So ist nach den Erfahrungen von UECKER (persönliche Mitteilung),der mit der gleichen Methode bei Nucleinsäuremarkierungen einen Einbau von bis zu 80 % des P-32 vorwiegend in die Nucleinsäuren erzielte,und von GUELIN und LEPIN (14),die bei der Markierung von Shigella paradysenteriae eine Aufnahme von 70 % fanden, anzunehmen,daß der Großteil des P-32 fest in die Nucleinsäuren eingebaut ist. Weitere Hinweise,daß die in den Versuchstieren wiedergefundene Radioaktivität dem markierten Antigen entspricht und sich nicht -in dem von mir untersuchten Zeitraum- wieder vom Antigen gelöst hat,werden unten diskutiert.

Nach dem letzten Waschen wurden die Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen ,der Titer wurde auf $1x10^9$Bakterien pro ml eingestellt und dann wurde der Impfstoff 75 min bei 60^oC durch Hitze inaktiviert. Danach wurde er noch zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.Der Titer des fertigen Impfstoffs wurde wieder auf $1x10^9$Bakterien pro ml eingestellt. Zur Sterilitätskontrolle wurden 0,3 ml des Impfstoffs in Bouillon 10 Tage lang bei 37^oC bebrütet;der Impfstoff war stets steril.

Die Antigen-Eigenschaften des Impfstoffes hatten durch den Prozess der Radiomarkierung nicht gelitten,ebensowenig durch die von dem P-32 emittierte Strahlung.Das konnte durch positiven Ausfall der spezifischen Probeagglutination (Objektträgeragglutination) mit den entsprechenden Anti-

körpern gezeigt werden sowie durch Bildung entsprechender spezifischer Antikörper beim Kaninchen in einem Kontroll-versuch,der weiter unten geschildert wird.

3.Methode der Versuche

a.) Die Applikation des Impfstoffs: Der Impfstoff wurde den Versuchstieren in einer Menge von jeweils 0,3 ml oral etwa 2 cm tief mit der Schlundsonde,rectal ebenfalls etwa 2 cm tief in das Rectum appliziert und im Kontroll-versuch subcutan unter die Rückenhaut injiziert.Die Tiere wurden dann getrennt nach Versuchsgruppen zu je 3 Tieren bis zur Tötung in Kunststoffkäfigen gehalten. Sie erhielten,zur Erhaltung gewohnter Umweltbedingungen, nach 15 min wieder Futter.
Nach Zeitabständen zwischen 10 min und 48 Std wurden die Tiere mit Aether getötet und sofort praepariert. Ich untersuchte Blut,Leber,Milz,Nieren,Lungen,Bronchial-system und Trachea,Oesophagus,von den Speicheldrüsen die Gl.submandibularis,Speichel,Magen,Dünndarm und Dickderm.Die Organe wurden durch Spülung in physio-logischer Kochsalzlösung von eventuell noch anhaftenden dem Organ nicht zugehörigen Gewebsteilen befreit.Dann wurden jeweils die 3 Organe einer Versuchsgruppe zu-sammen lysiert und weiteruntersucht.Die Messergebnisse sind also schon im Versuch gebildete Mittelwerte aus drei Tieren.Insgesamt wurden 4 Versuchsreihen durch-geführt,so daß durch Verwendung von jeweils 12 Tieren bzw.Organen brauchbare Mittelwerte erzielt wurden und die biologische Streuung auf ein erträgliches Maß herabgedrückt wurde.
b.) Die Lysierung der Organe: Zur Zerkleinerung der Organe bis zur kleinstmöglichen Teilchengrösse wählte ich anstatt der mechanischen Homogenisierung,die sich als zu grob erwiesen hatte,die Methode der Lysierung mit konzentrierter Kalilauge.Nach den Vorversuchen ergab sich

ein optimaler Effekt,wenn die Organe mit 5-normaler Kalilauge im Verhältnis 1:10 versetzt wurden.Dabei wurden sie bei Zimmertemperatur in einer Zeit von 10 bis 12 Stunden vollständig lysiert.

c.) Die Messung der Radioaktivität: Von diesem Lysat wurden 0,1 ml auf Fließpapierplättchen,die in die Schälchen eines Probenwechslers gelegt wurden,aufgetragen und unter dem Geiger-Müller Endfensterzählrohr gemessen.

Da nun jede emittierte Strahlung von den sie umgebenden Masseteilchen bis zu einem gewissen Grad absorbiert wird,war es unerlässlich,den Grad der Absorption für die einzelnen Organe festzustellen.

Dazu führte ich folgenden Versuch durch: Zuerst wurde eine bestimmte Menge Impfstoff,die im Verhältnis der in den Tierversuchen verwendeten Menge entsprach,mit Kalilauge ,die mit Wasser im Verhältnis 10:1 gemischt war, verdünnt und gemessen.Dann wurde die gleiche Menge Impfstoff,mit Organlysat verdünnt,gemessen.Die Impfstoff- und Organlysat-Verdünnung entsprachen sich also mengenmässig.Für die einzelnen Organe ergaben sich danach folgende Werte:

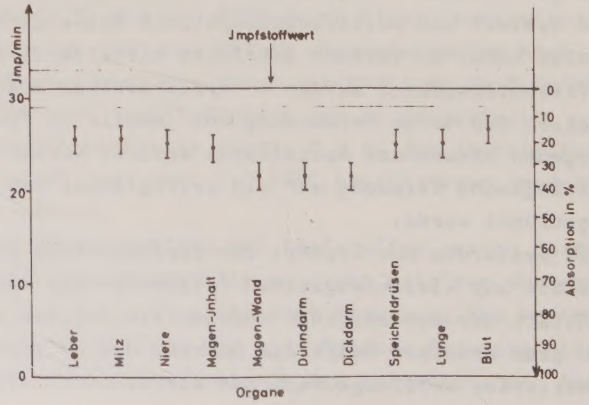


Abbildung 1: Absorption der P-32-Strahlung durch Organlysate

Wie aus der Abbildung zu ersehen ist,wurden für den Impfstoff alleine 31,0 Imp/min gemessen.Diese Zahl wurde gleich 0 % Absorption gesetzt und 0,0 Imp/min gleich 100 % Absorption.Dadurch war es möglich,die gezählten Impulse der einzelnen untersuchten Organ= lysate in %-Zahlen umzurechnen,die den Grad der Ab= sorption durch die verschiedenen Organteilchen an= geben.Indem ich diese Zahlen auf den Ausgangswert bezog,konnte ich die jeweiligen Korrekturfaktoren ermitteln.

Tabelle 1:

untersuchtes Organ	Imp/min	Absorption Imp/min	%	Korrektur= faktor
Impfstoff	31,0	0	0	0,00
Leber	25,0	6	20,5	1,24
Milz	25,0	6	20,5	1,24
Niere	25,0	6	20,5	1,24
Mageninhalt	25,0	6	20,5	1,24
Magenwand	22,0	9	30,0	1,40
Dünndarm	22,0	9	30,0	1,40
Dickdarm	22,0	9	30,0	1,40
Speicheldrüse	24,0	7	24,0	1,29
Lunge	24,0	7	24,0	1,29
Blut	28,0	3	10,2	1,11

Mit diesen Korrekturfaktoren wurde der jeweilige gemessene Wert multipliziert,das Ergebnis entsprach dann dem tatsächlichen Wert.

Noch eine zweite Korrektur musste vorgenommen werden, da P-32 nur eine kurze Halbwertszeit hat (14,2 Tage), und deshalb schon bei einer einen Tag nach der Mar= kierung durchgeführten Messung der Aktivitätsabfall zu berücksichtigen ist.Dazu wurde bei jeder Messung der Impfstoff alleine mitgemessen und gleich 100 % ge= setzt.Die für die Organe ermittelten Werte wurden dann als Prozent von diesem Impfstoffwert angegeben. Dadurch ist es möglich,den Aktivitätsabfall innerhalb der Ver= suchsdauer zu eliminieren und alle Werte miteinander zu vergleichen.

Da nun mehr als der absolute Gehalt die relative Ver=

teilung des Impfstoffes im Mäuseorganismus auf die einzelnen Organe interessierte,ermittelte ich (rechnerisch) die relative Radioaktivität pro 1 Gramm Maus und setzte die gefundenen Organwerte dazu in Beziehung. Auf diese Weise erhielt ich eine Prozentzahl,welche angibt,um wieviel mal mehr Aktivität ich in dem betreffenden Organ vorfand,als ich vorgefunden hätte, wenn sich der Impfstoff gleichmässig in dem Tier verteilt hätte.Die Ordinatenwerte der Kurven geben also Auskunft über die Anreicherung des Impfstoffes in den untersuchten Organen und damit schon als Einzelwerte Hinweise auf eventuelle Speicherung.

d.) Der statistische Fehler der Messung: Legt man den einfachen statistischen Fehler (Standardabweichung) für die Messung zugrunde,so lässt sich der Messfehler aus der jeweiligen Impulsvorwahl errechnen. Bei einer Vorwahl von 500 gezahlten Impulsen beträgt der Fehler:

$$\Delta M = \pm \sqrt{500} = \pm 22{,}36 \text{ das entspricht } 4{,}33\ \%.$$

Für den Nullwert (U) von durchschnittlich 30 Imp/min ergibt sich dann der Fehler:

$$U \pm \Delta U = \frac{30 \pm 4{,}33}{100} = 30 \pm 1{,}29$$

Für einen gemessenen Wert (M) gilt ebenso:

$$M \pm \Delta M = \frac{M \pm 4{,}33}{100}$$

Für R=M-U,also für den tatsächlichen Wert über dem Nullwert gilt dann nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz:

$$R \pm \Delta R = R \pm \sqrt{\Delta U^2 + \Delta M^2} \text{ Imp/min .}$$

Das sei an einem Beispiel kurz erläutert:
Der gemessene Wert M sei 70 Imp/min.Der tatsächliche Wert R ist dann R=M-U,also 70-30=40 Imp/min.
Der statistische Messfehler ΔR ergibt sich nun aus

$$\begin{aligned} R \pm \Delta R &= 40 \pm \sqrt{1{,}29^2 + 3{,}05^2} \\ &= 40 \pm \sqrt{10{,}06} \\ &= 40 \pm 3{,}24 \text{ Imp/min .} \end{aligned}$$

Für den Bereich der bei meinen Versuchen in Frage kommenden Werte ergibt sich somit folgende Beziehung:

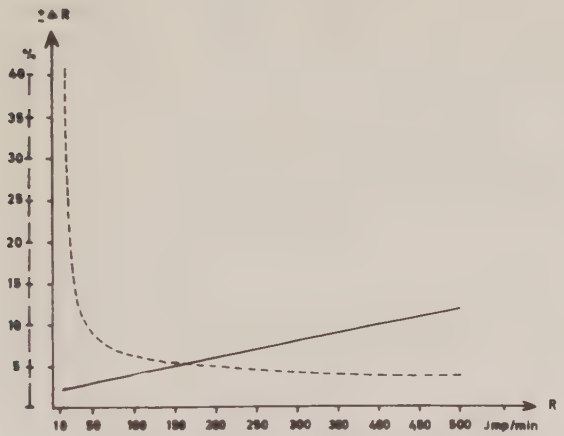


Abbildung 2: Abhängigkeit des prozentualen Messfehlers von der Impulsvorwahl

Mit steigender Impulszahl R sinkt der Messfehler, in Prozent ausgedrückt, von 40 % bei 5 gemessenen Impulsen auf 5 % bei 300 gemessenen Impulsen ab.

4. Methode der Kontroll-Versuchsreihe Nr. 1

Diese Versuchsreihe wurde angestellt, um die Radioaktivität (und damit den Antigen-Gehalt) im strömenden Blut der Schwanzgefässe nicht nur in Form von Stichproben, sondern direkt und kontinuierlich messen zu können.
Dazu wurde die Maus in einem röhrenförmigen Kunststoff-käfig, der nur wenig weiter war als sie selbst, gehalten. Ihr Schwanz wurde durch ein Loch in einer Bleiabschirmung, welche die oral immunisierte Maus von den Zählrohren

trennte,geführt und zwischen zwei Geiger-Müller-Endfensterzählrohren fixiert.So konnte die Radioaktivität des Blutes fortlaufend gemessen und aufgezeichnet werden. Die Tiere erhielten während der Dauer des Versuches Futter;radioaktive Ausscheidungen fielen durch eine Öffnung im Boden des Käfigs außer Reichweite der Zählrohre.

5. Methode des Kontrollversuches Nr.2

Dieser Versuch wurde durchgeführt,um einen weiter unten geschilderten Befund zu überprüfen. Nach diesem Befund gelangte neben dem oral verfütterten auch das rectal und subcutan applizierte Impfstoffmaterial in den Magen bzw. in den Mageninhalt. Durch den Kontrollversuch Nr.2 sollte untersucht werden,ob dieses Material noch antigen-wirksam ist. Ferner konnte ich dadurch zeigen,daß das Antigen durch den Prozess der Radiomarkierung sowie durch die von dem Radionuklid emittierte Strahlung nicht gelitten hatte.
Zu diesem Zweck wurde Kaninchen der Mageninhalt von Mäusen,denen kurz zuvor der Impfstoff rectal appliziert worden war,intravenös bzw. intraperitoneal injiziert.

Zur Herstellung des Impfstoffes,der den Kaninchen injiziert werden sollte,applizierte ich weißen Mäusen rectal je 0,3 ml radiomarkierten Impfstoff,der nach dem oben geschilderten Verfahren hergestellt worden war. Nach 30 min wurde der Magen steril entnommen. Der Mageninhalt wurde mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und grob filtriert.Das Filtrat wurde danach 75 min bei 60°C hitzeinaktiviert. Dieser Impfstoff wurde nun 6 Kaninchen in den in der Tabelle 2 angegebenen Dosen und Zeitabständen injiziert,und zwar je 3 Tieren intravenös bzw. intraperitoneal.
Als Kontrolle hatte ein Tier den genau so behandelten Mageninhalt nicht immunisierter Mäuse erhalten.

Tabelle 2. Impfplan der Kaninchen :

Impfung	Tage	Impfstoff	Titer
I	0.	0,5 ml	$1,3x10^{10}$/ml
II	5.	1,0 ml	$1,1x10^{10}$/ml
III	9.	1,5 ml	$2,4x10^{10}$/ml
IV	12.	2,0 ml	$2,1x10^{10}$/ml
V	15.	2,5 ml	$2,1x10^{10}$/ml

Am 25. Tag wurde den Kaninchen Blut entnommen,mit dem am 26.Tag der Gruber-Widal Test angestellt wurde. Es zeigte sich dabei,daß die Kaninchen spezifische Antikörper gegen das Breslau-Antigen gebildet hatten.

Ergebnisse

Nach allen drei Applikationsarten konnte die Radioaktivität nach sehr kurzer Zeit im strömenden Blut der Schwanzgefässe nachgewiesen werden. Auf der Abbildung 3 ist zu sehen,daß bereits nach 10 min ein Aktivitätsspiegel im Blut nachweisbar ist,dessen Werte über dem möglichen statistischen Fehler liegen. Dieser Spiegel war nach allen drei Applikationsarten zu finden. Er steigt in den ersten Stunden noch weiter an und hält sich mit Schwankungen über 48 Std.
Da diese Schwankungen außer durch die wechselnde Resorption und Ausscheidung des Impfstoffes aus dem Magen-Darm-Trakt (wobei auffällig ist,daß auch die Messwerte der subcutan immunisierten Tiere stark schwanken) sicher auch noch durch die Versuchsanordnung,bei der ich ja nur Stichproben entnehmen konnte, bedingt ist,führte ich die Kontroll-Versuchsreihe Nr.1 durch. Dabei konnte die Aktivität des Blutes direkt und kontinuierlich gemessen werden. Zu beachten ist dabei,daß die Kurve durch integrierende Messung gewonnen wurde,und die einzelnen Werte über einen Zeitraum von je 60 sec gemessen sind. Schwankungen im Bereich dieser Dämpfung (60 sec) sind also nicht erfasst.
Für die Abbildung 4,die das Ergebnis dieser Versuche ist,habe ich,um die Abszisse zu raffen,jeweils die Werte der vollen Stunden von dem Meßstreifen abgetragen und aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt wieder, daß der markierte Impfstoff schnell resorbiert wird und sich innerhalb des untersuchten Zeitraumes auf einem hohen Spiegel hält. Es ist also sicher,daß der Impfstoff auch nach oraler Applikation nach kurzer Zeit im Blut erscheint.
Als weitere Organe untersuchte ich die mit großer RES-Aktivität,die Leber und Milz. Dabei stehen die

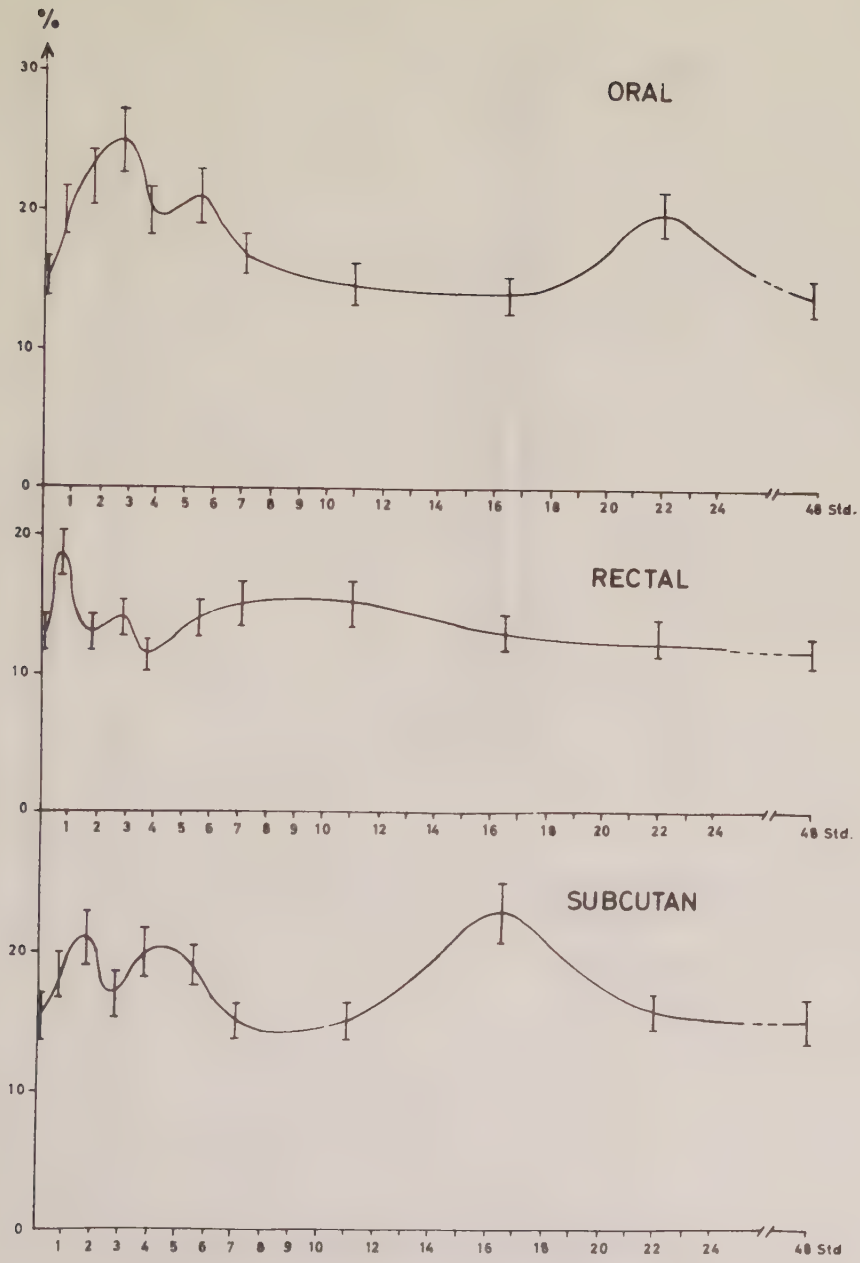
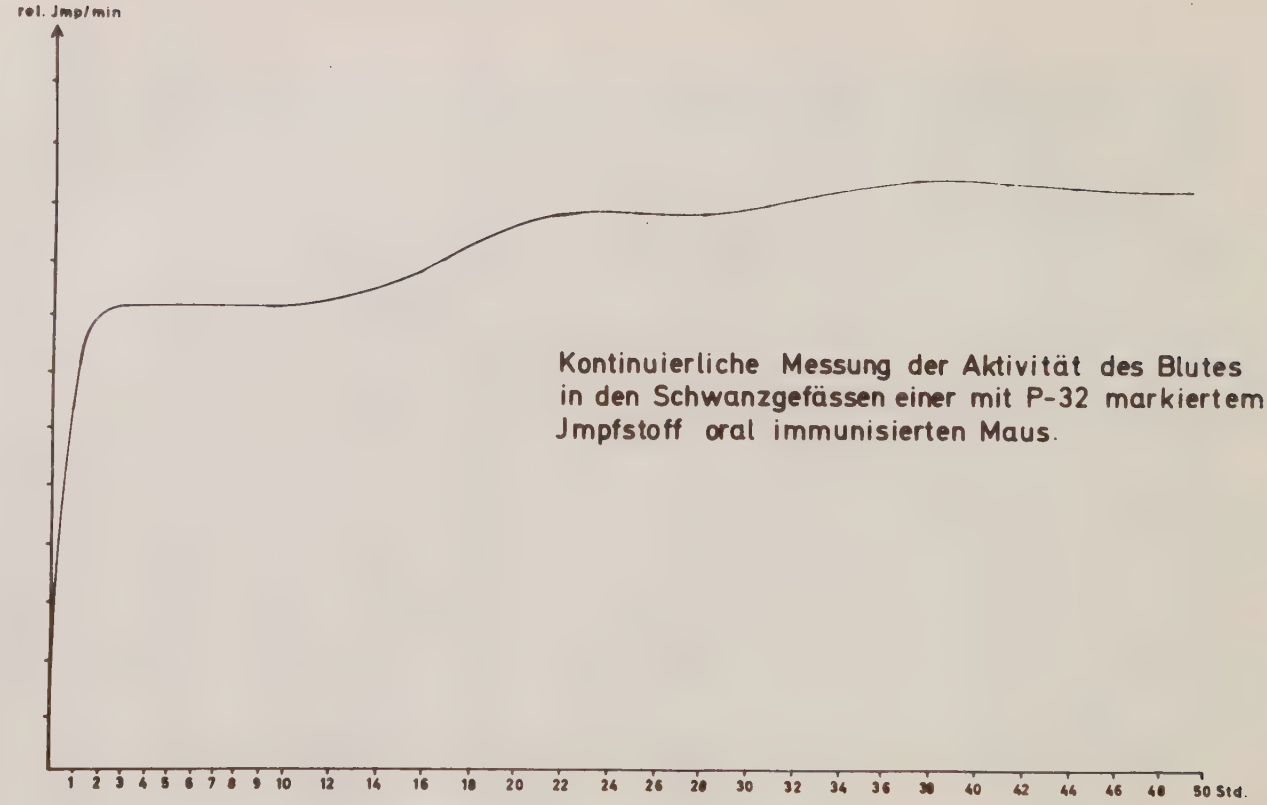


Abbildung 3: Aktivität des Blutes



Kontinuierliche Messung der Aktivität des Blutes in den Schwanzgefässen einer mit P-32 markiertem Impfstoff oral immunisierten Maus.

Abbildung 4: Aktivität des Blutes

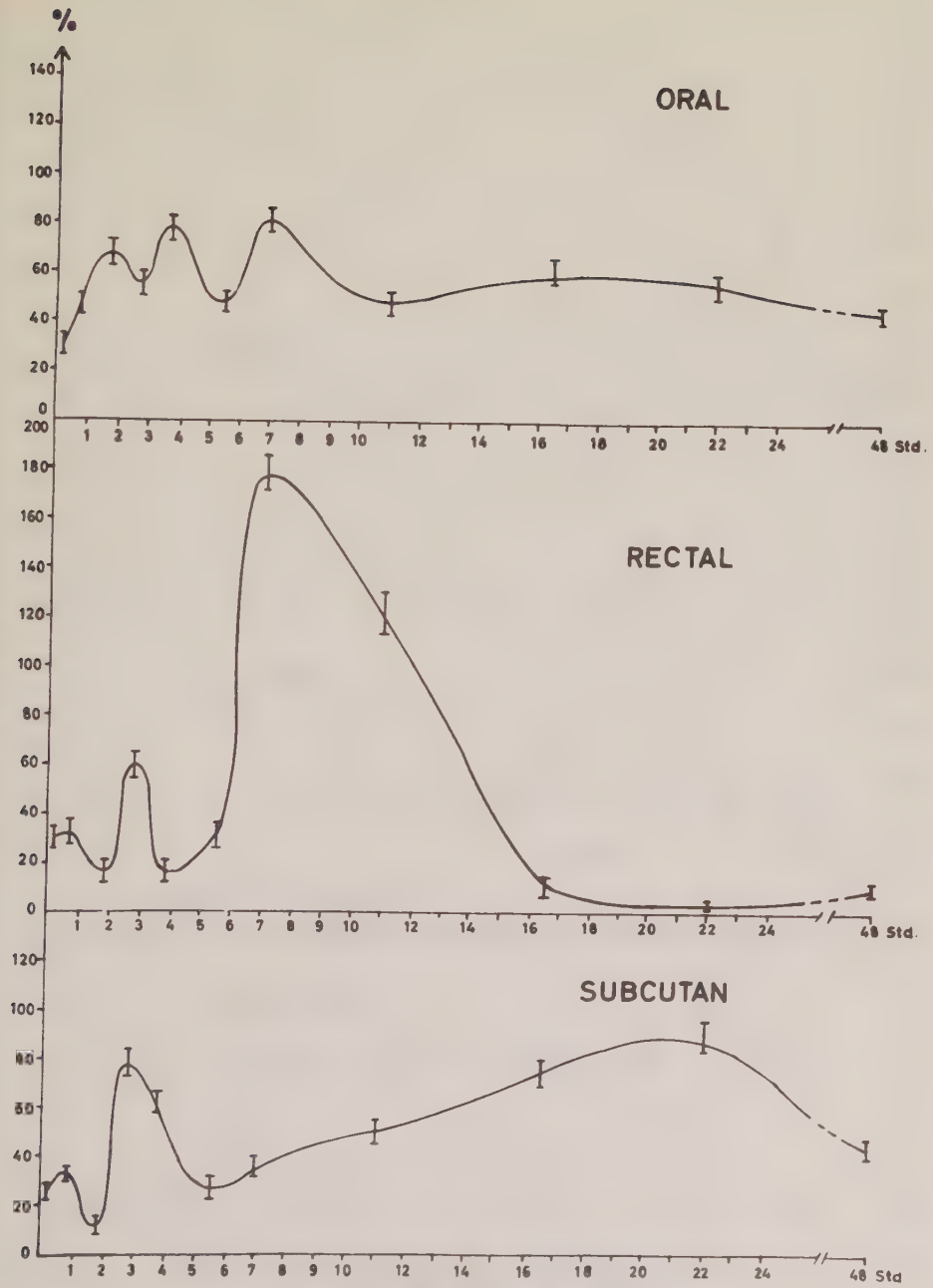


Abbildung 5: Aktivität der Milz

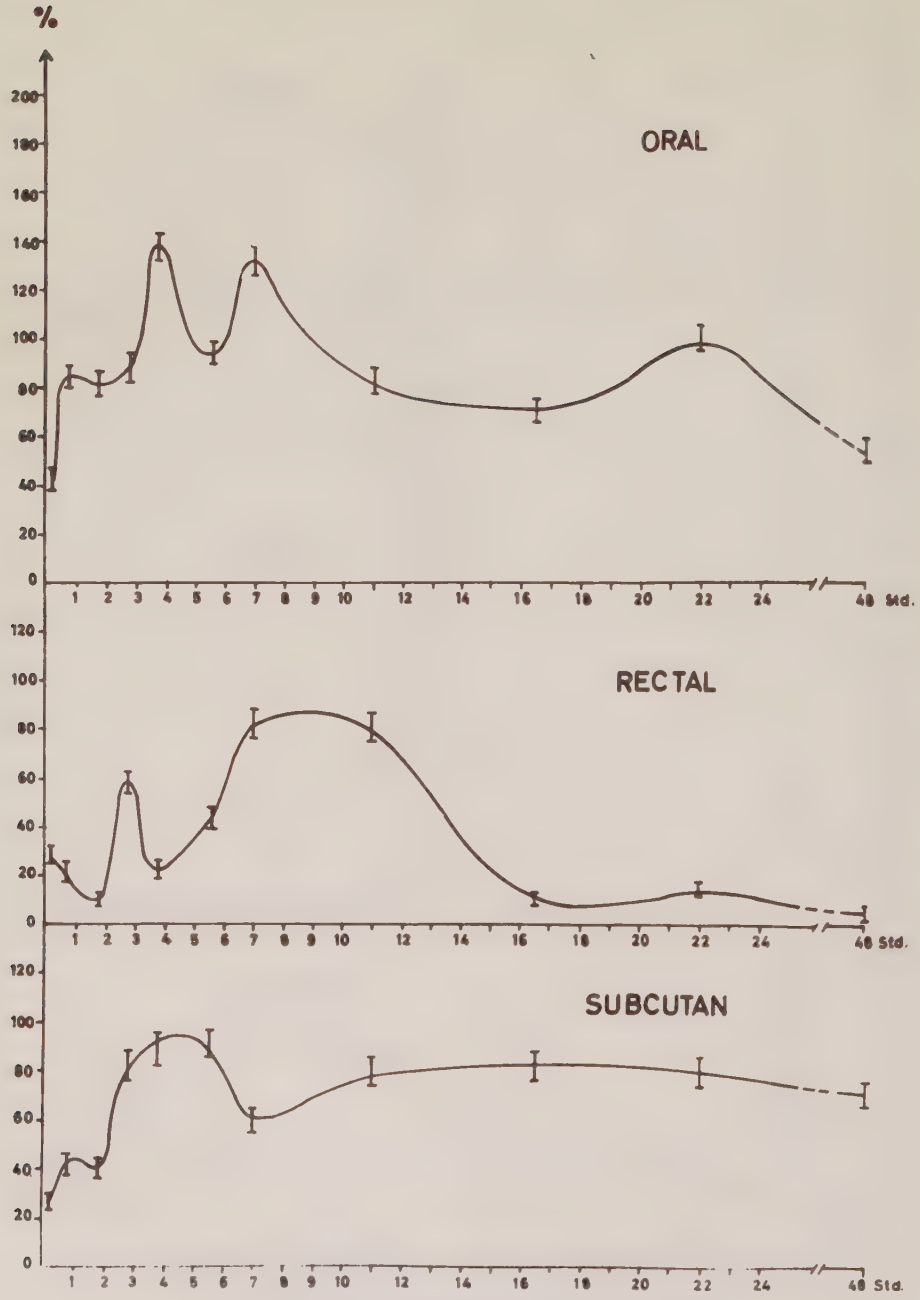


Abbildung 6: Aktivität der Leber

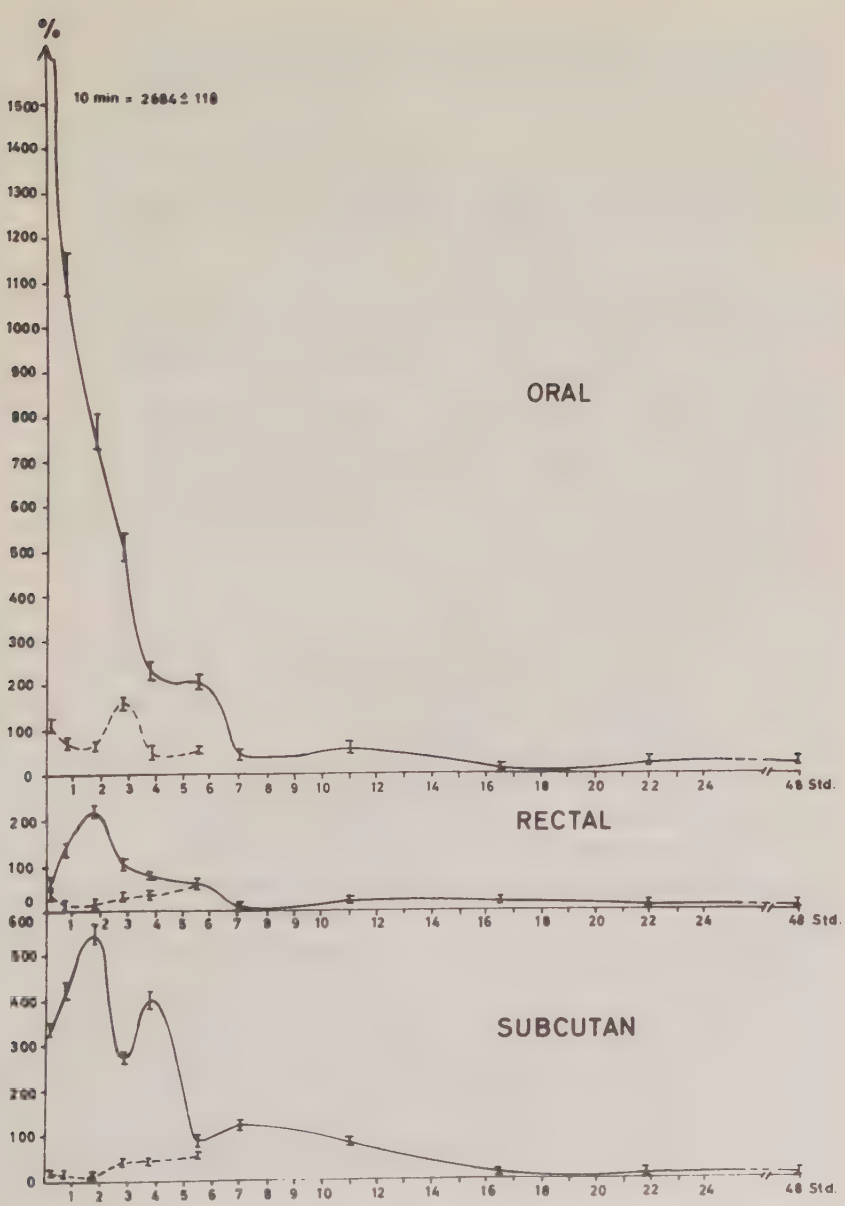


Abbildung 7: Aktivität des Mageninhaltes ——
Aktivität der Magenwand – – – –

Reticulumzellen und Sinusendothelien der Milz gleichzeitig stellvertretend für die RES-Anteile von Knochenmark und Lymphknoten.
Es muss hier hervorgehoben werden,daß die Untersuchung der ganzen Organe im Hinblick auf die sehr feinen Strukturen des RES nur grob qualitativ und als Hinweise zu betrachten sind. Andererseits ist bekannt,daß nur die mesenchymalen- und RES-Anteile dieser Organe an den Vorgängen um die Antikörperbildung beteiligt sind (12). Eingehendere Untersuchungen müssten die Histoautoradiographie zur Hilfe nehmen.
Auch bei der Milz (Abbildung 5) und der Leber (Abbildung 6) fand ich schon nach 10 min eine deutliche Anreicherung der Aktivität. Dabei fielen auch bei diesen Organen Schwankungen im Verlauf der Kurve auf,deren Amplituden weitaus größer sind als die der Blutwerte. Ihre vermutliche Ursache wird in der Diskussion besprochen. Sie können nicht nur durch die auf diese Organe aufgesetzten Schwankungen der Blutwerte verursacht sein. Nach den Abbildungen 5 und 6 steht aber fest,daß die Organe mit RES-Aktivität mit dem Impfstoff beschickt werden und ihn speichern.

Die nächste Abbildung (Nr.7) zeigt die Werte des für die orale Applikation wichtigsten Organs,des Magens. Nach Verfütterung mit der Schlundsonde ist die Aktivität und entsprechend der Impfstoffgehalt des Magens sofort sehr hoch und sinkt dann entsprechend dem Weitertransport des Speisebreies auf niedrigere Werte ab.
Zur genauen Differenzierung untersuchte ich jetzt den Mageninhalt und die Magenwand getrennt. Um auszuschließen, daß Reste des hochaktiven Mageninhaltes an der Wand hängen blieben und so eine Aktivität der Magenwand vortäuschten,wurde der Magen sofort nach der Praeparation in eisgekühlte Schalen gelegt,wo er in kurzer Zeit gefror.

Der gefrorene Mageninhalt konnte dann als glattwandiger Block aus dem aufgeschnittenen Magen entfernt werden. Die Magenwand wurde anschließend mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gespült. So erreichte ich eine möglichst vollständige Trennung von Mageninhalt und Magenwand. Dabei stellte ich fest,daß der überwiegende Teil der Aktivität im Mageninhalt zu finden war.

Bei Betrachtung der Kurven der Kontrollversuche der rectalen und subcutanen Impfung zeigt sich,daß auch hier große Aktivitätsmengen im Mageninhalt gefunden wurden. Daraus,daß bei der rectalen Applikation die Aktivität nie die Werte erreicht,die nach subcutaner Zufuhr gefunden wurden,muss man schließen,daß ein Teil des eingeführten Impfstoffes auf dem natürlichen Wege wieder ausgeschieden wird,bevor er zur Resorption gelangt.

Bei der Abbildung 7 fallen besonders bei der Kurve der subcutan geimpften Tiere die starken Amplitudenschwankungen in den ersten 8 Stunden auf. Dabei ist zu beachten,daß die Schwankungen in der Resorption und Sekretion und im Weitertransport des aktiven Chymus von Tier zu Tier so weit unterschiedlich sind,daß aus den ermittelten Werten kein statistischer Ausgleich herzustellen war. Sicher ist nur,daß sie nicht nur auf Grund des Weitertransportes des Chymus entstanden sein können,sondern es müssen sich hier mehrere Kurven überlagern,denen auch mehrere biologische Äquivalente zugeordnet werden müssen,oder ein Äquivalent mit wechselnden Änderungen seines Funktionszustandes. So ist aus der Tatsache,daß auch bei der subcutanen und rectalen Applikation eine absolute Aktivität vorliegt,welche weit über der der Blutwerte liegt,zu schließen,daß eine Sekretion nicht nur über das Blut,sondern auch über Munddrüsen oder den Respirationstrakt erfolgt sein kann.

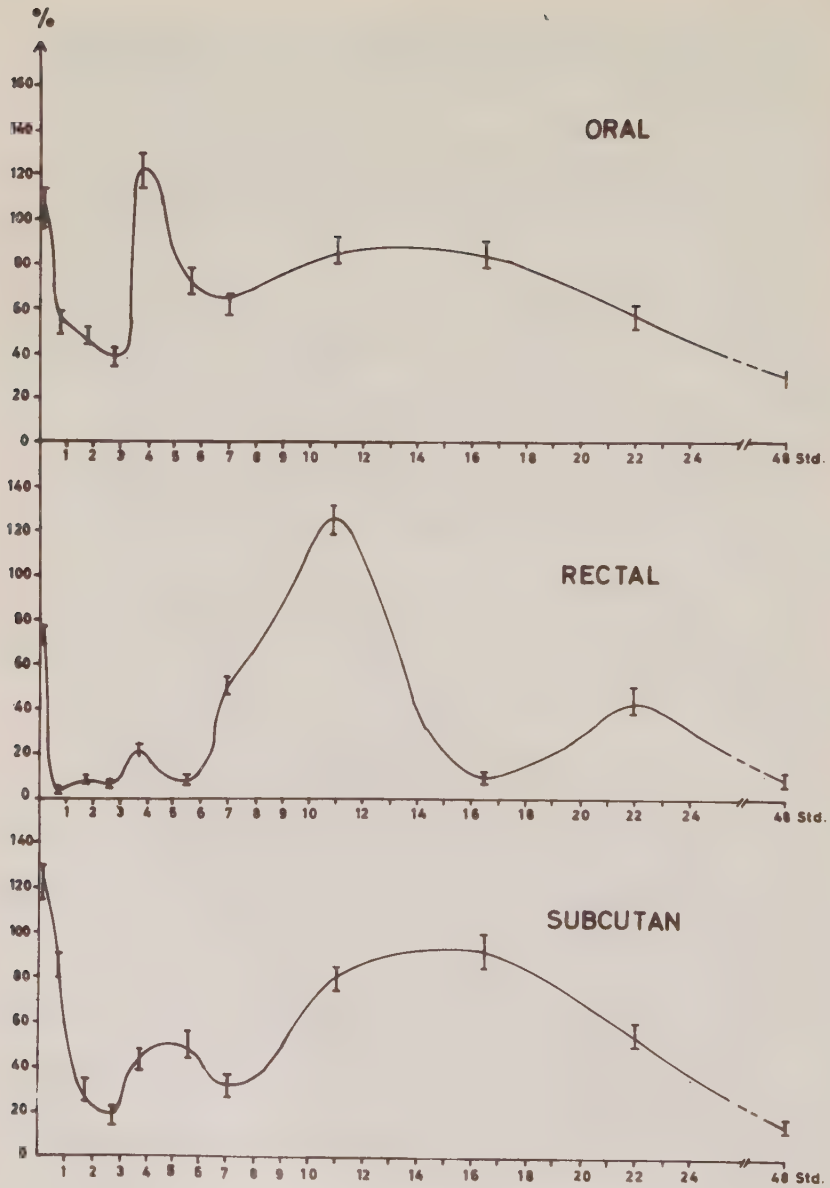


Abbildung 8: Aktivität des Oesophagus

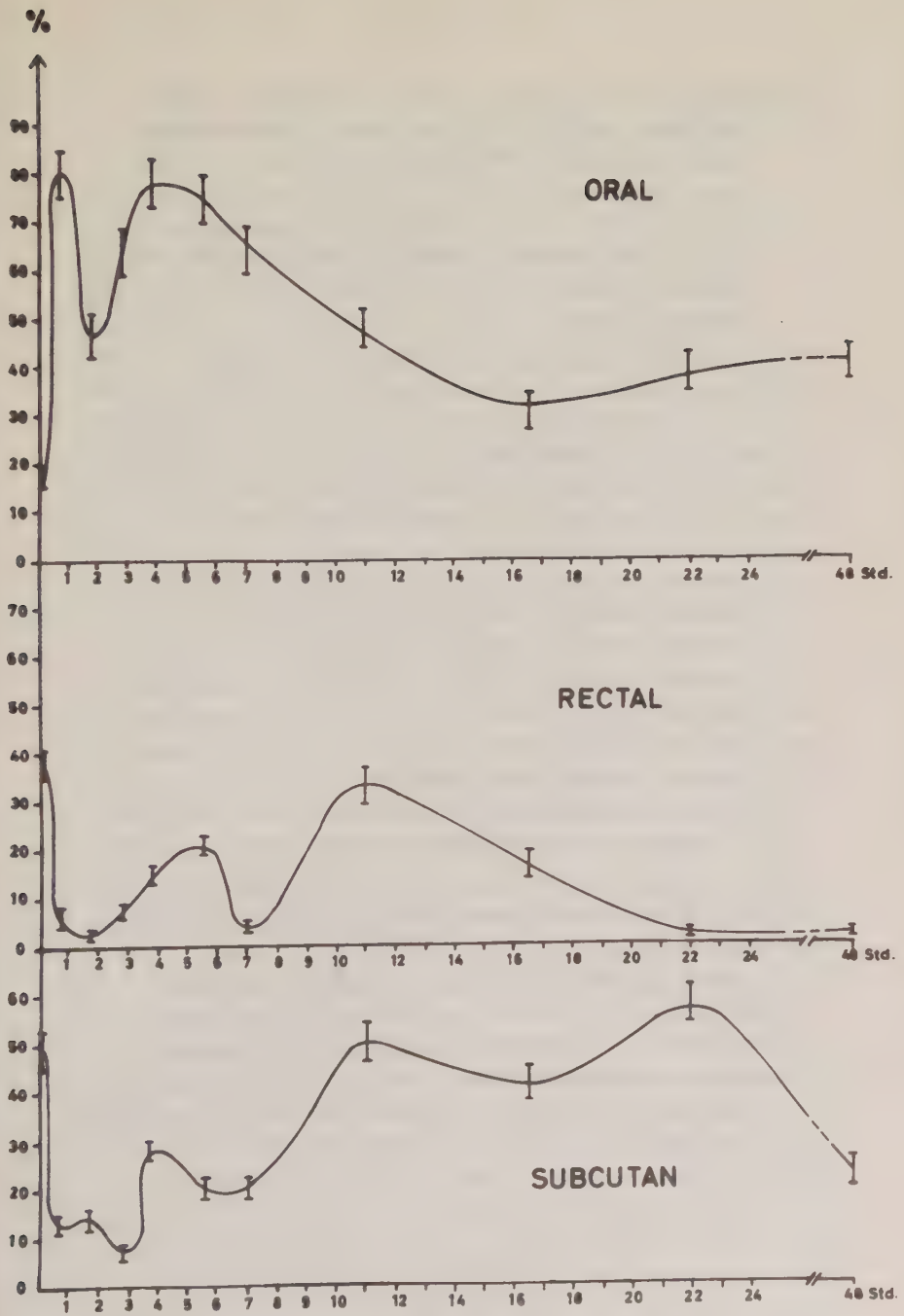


Abbildung 9: Aktivität der Gl. submandibularis

Von diesen Befunden müssen zwei festgehalten werden.

1.) Auch nach rectaler und subcutaner Applikation finden sich große Mengen der Aktivität im Magen=inhalt wieder.

2.) Der Verlauf der Kurven lässt auf Überlagerung mehrerer Mechanismen,durch die der Impfstoff in den Magen gebracht und wieder aus ihm entfernt wird,schließen.

Die einfachste Erklärung für Punkt 1 ist,daß die Tiere nach der rectalen Applikation ihren Kot ge=fressen und nach der subcutanen Injektion durch Lecken an der Injektionsstelle ebenfalls Aktivität verschluckt hätten. Dazu führte ich Kontrollversuche durch,bei denen die Tiere in den in "Material und Methoden" beschriebenen Röhrenkäfigen gehalten wurden,und zwar vom Zeitpunkt der Applikation des Impfstoffes bis zu ihrer Tötung. Dadurch wurde eine Koprophagie,welche bei weissen Mäusen nur während Hungerperioden bekannt ist,und das eventuelle Lecken an der Injektionsstelle unterbunden. Dabei ergeben sich die gleichen Befunde wie oben. Eine wiederholte Zufuhr des Impfgutes kann also ausgeschlossen werden. Ebenso ist eine postmortale Imbibition des Magens mit dem Impfstoff ausgeschlossen, da die Tiere sofort nach der Tötung praepariert wurden.

Zu der Frage,wie der Impfstoff innerhalb des Organismus der Maus in den Magen gelangt,stehen drei mögliche Wege zur Diskussion.

1.) Sekretion über die Drüsen der Magenschleimhaut.

2.) Sekretion über die Drüsen oder die Becherzellen der Bronchialschleimhaut oder über das Lungen=parenchym,von wo der Impfstoff auf dem Wege über den Rachen und den Oesophagus in den Magen gelan=gen kann.

3.) Sekretion über die Drüsen der Mundhöhle mit an=schließendem Verschlucken.

Ich prüfte diese Möglichkeiten und kam zu folgenden Ergebnissen:

Zu Punkt 1 : Auf der Abbildung 7 ist zu sehen,daß auf den Kurven nach rectaler und subcutaner Applikation ein weitaus langsamerer Anstieg der Aktivität der Magenwand als des Mageninhaltes stattfindet. So fand ich zum Beispiel bei den subcutan geimpften Tieren nach 10 min in der Magenwand 30 %,im Mageninhalt aber schon 340 % mehr Aktivität,als ich gefunden hätte, wenn sich der Impfstoff gleichmäßig in dem Tier verteilt hätte. Es hat also schon nach 10 min eine Anreicherung im Mageninhalt stattgefunden,während die Wand nur wenig mehr Radioaktivität enthielt,als das Gesamttier bei gleichmäßiger Verteilung enthalten hätte.

Aus diesem Befund muss ich schließen,daß die Hauptmenge des Impfstoffes einen anderen Weg als über die Magenwand eingeschlagen hat. Eine -relativ geringe- Sekretion kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Bei den Wegen 2 und 3 muss die Aktivität stets über den Oesophagus in den Mageninhalt gelangen. Die Untersuchung dieses Organs (Abbildung 8) zeigt in der Tat nach oraler wie nach subcutaner und rectaler Applikation hohe Werte. Auch hier fallen wieder starke Amplitudenschwankungen auf.

Zu Punkt 2 : In Lungen und Bronchialsystem (Abbildung 10 und 11),die getrennt untersucht wurden,zeigen sich nach allen drei Applikationsarten Aktivitätsmengen,die über denen der Blutwerte liegen. Es muss also auch hier eine Anreicherung stattgefunden haben. Ob nun das Lungenparenchym,die in den Bronchialwänden liegenden Schleimdrüsen oder die bronchialen Becherzellen sezernieren, konnte ich mit meiner Methode nicht beantworten.

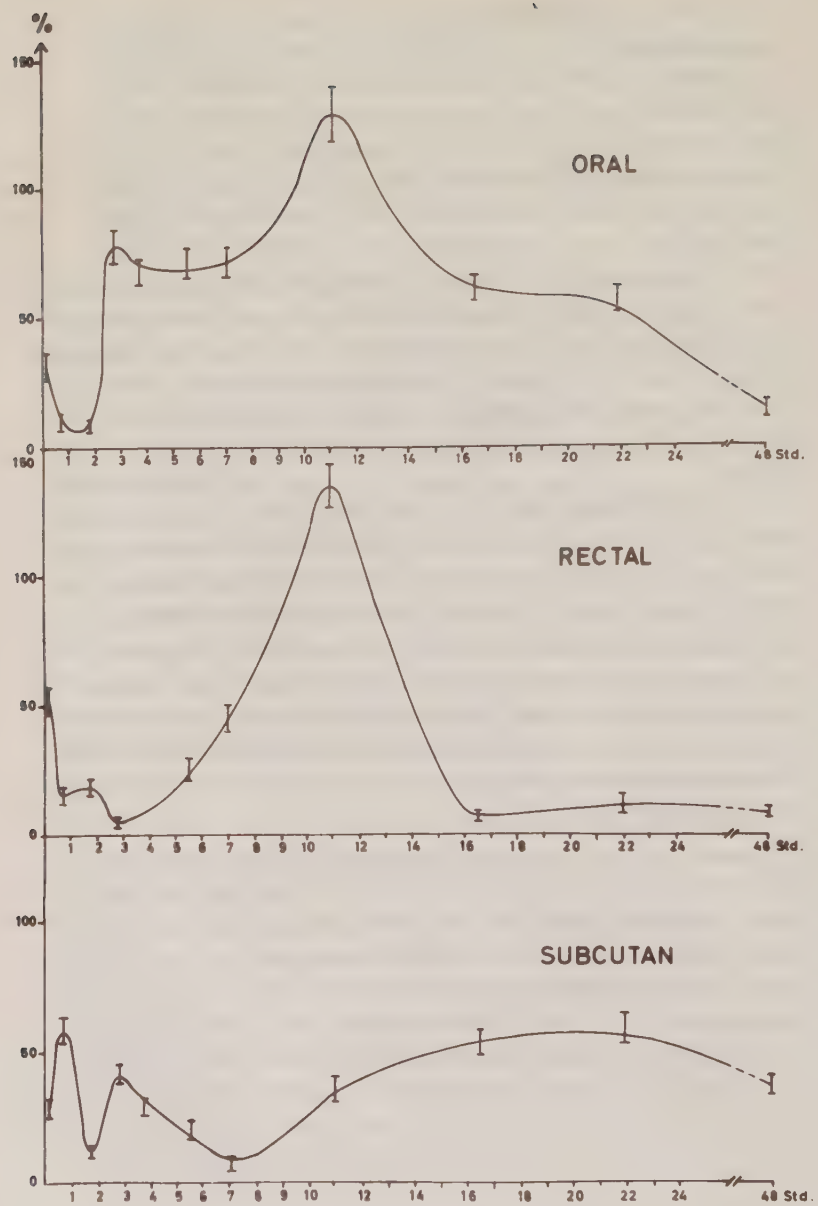


Abbildung 10: Aktivität der Lunge

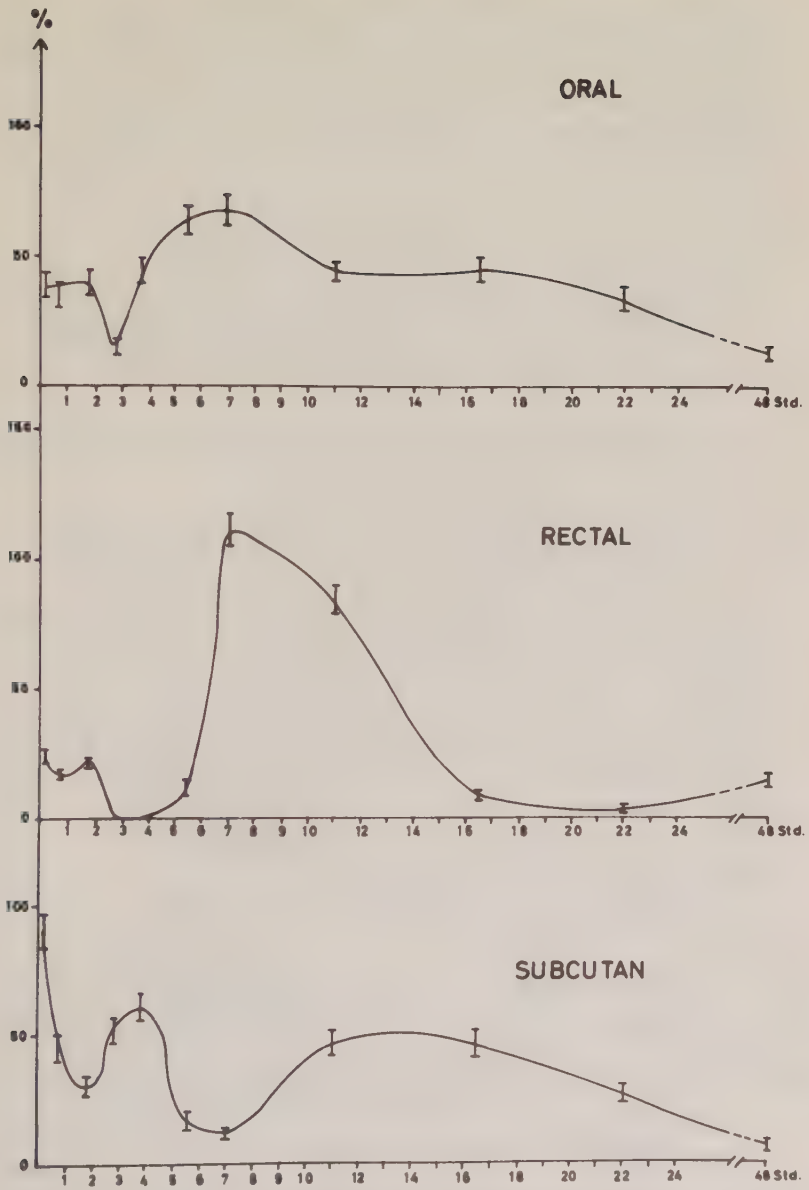


Abbildung 11: Aktivität des Bronchialsystems

Zu Punkt 3: Von den Speicheldrüsen untersuchte ich die Gl.submandibularis. Diese Drüse ist so gut darstellbar, daß sie praepariert werden kann, ohne daß ein Kontakt mit dem eventuell Aktivität enthaltenden Rachenraum statthat. Es ist also sicher, daß die gemessene Radioaktivität der aus der Gl.submandibularis entspricht. Wie die Abbildung 9 zeigt, ist nach der oralen Gabe ein rascher Anstieg zu sehen, der sich über 48 Std hält. Nach der rectalen Gabe fand ich entsprechend den schlechteren Resorptionsverhältnissen einen wechselnden, aber doch stark positiven Befund, und nach der subcutanen Kontrolle einen langsameren Anstieg bis 24 Std.

Die drei erwähnten Punkte können endgültig nur durch die Histoautoradiographie geklärt werden.

Dem Einwand, daß sich das Radionuklid P-32 sofort nach dem Einbringen des Impfstoffes in den Tierkörper wieder von den Bakterien gelöst hat, oder daß ich nur antigen-unwirksame Bruchstücke des Breslau-Vollantigens nachgewiesen habe, stehen die Ergebnisse der Kontrollversuchsreihe Nr.2 entgegen. Die Kaninchen dieser Versuchsreihe bildeten auf die Impfung mit dem Mageninhalt der immunisierten Mäuse hin spezifische Antikörper, so daß der Mageninhalt das entsprechende spezifische Antigen enthalten haben muss. Die Antikörper wurden mit Hilfe des Gruber-Widal-Testes nachgewiesen. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

Kaninchen Nr.1 war positiv bis Titer 1:640
" Nr.2 " " " Titer 1:640
" Nr.3 " " " Titer 1:640
" Nr.4 " " " Titer 1:320
" Nr.5 " " " Titer 1:320
" Nr.6 " " " Titer 1:640
" Nr.7 " negativ (Kontrolle)

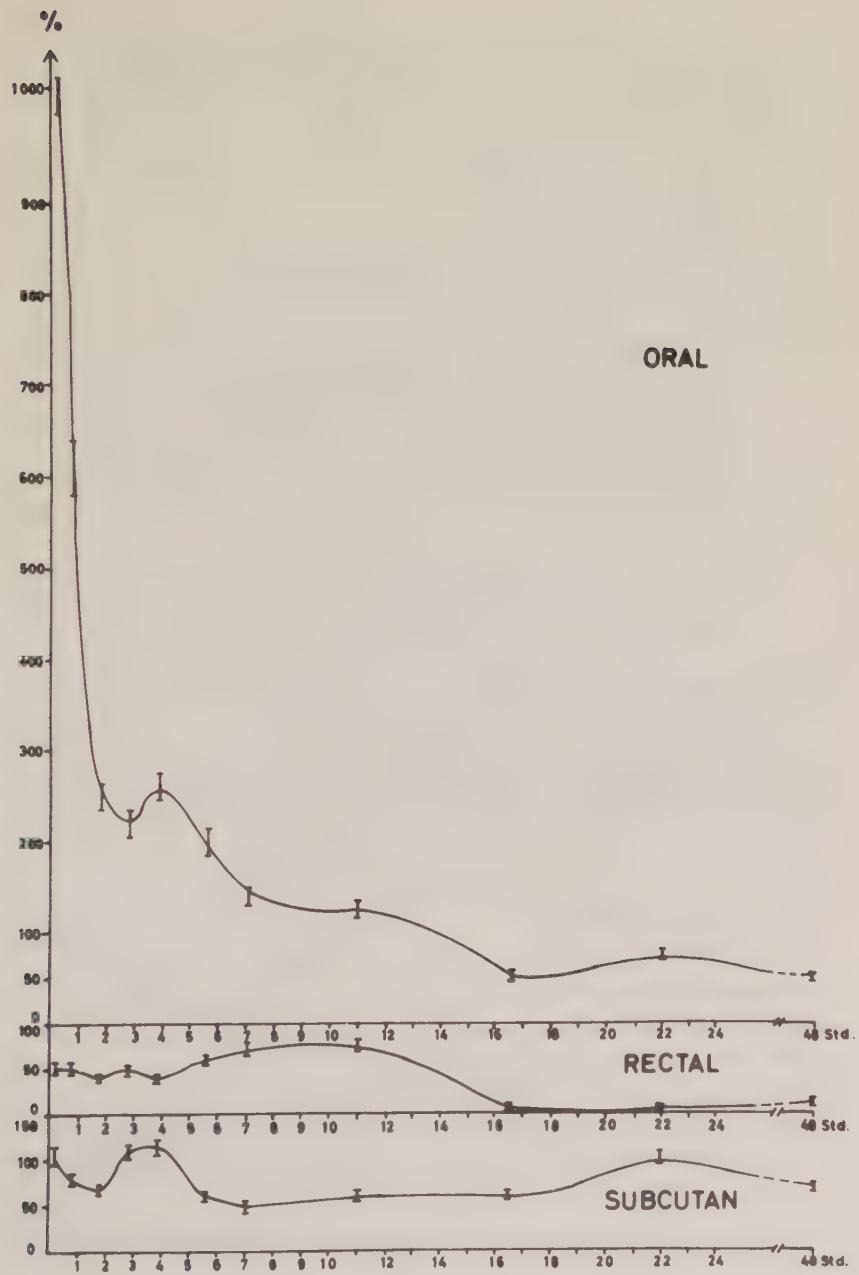


Abbildung 12: Aktivität des Dünndarms

Bei allen Tieren war vor Versuchsbeginn eine Probeblutentnahme vorgenommen worden. Der Gruber-Widal-Test war hierbei stets negativ ausgefallen.
Aus dieser Versuchsreihe kann man folgendes schließen:

1.) Der Impfstoff ist auch noch in markierter Form antigen-wirksam.
2.) Es muss tatsächlich ein Transport von der Injektionsstelle in den Mageninhalt stattgefunden haben.
3.) Wenn der Impfstoff noch antigen-wirksam ist,kann er noch nicht abgebaut worden sein. Es ist demnach unwahrscheinlich,daß das Radionuklid,das,wie oben angeführt wurde(14),in die Nucleinsäure der Bakterien eingebaut worden war,wieder von den Bakterien getrennt wurde.
4.) Da auch nach Passage des Magens die Antigen-Wirksamkeit noch vorhanden war,konnte die Salzsäure des Magens in der von mir untersuchten Zeitspanne das Antigen nicht entscheidend geschädigt haben.

Ich halte also fest,daß auch nach subcutaner und rectaler Applikation antigen-wirksamer Impfstoff in den Mageninhalt gelangt,und daß die hohen Werte in der Gl.submandibularis und im Respirationstrakt eine Sekretion des Impfstoffes über diese Organe mit nachfolgender Passage durch die Speiseröhre vermuten lassen.

Wie ist nun das weitere Schicksal des Impfstoffes im Magen-Darm-Kanal?
Der rasche Anstieg der Aktivität im Dünndarm nach oraler Gabe des Impfstoffes (Abbildung 12) war aller Wahrscheinlichkeit nach durch reflektorische Öffnung des Pylorus beim Einbringen des Impfstoffes in den Magen bedingt. Nicht durch äußere Einflüsse bedingt war dagegen der ebenfalls rasche Anstieg nach rectaler und subcutaner Applikation. Bei der Kurve nach subcutaner

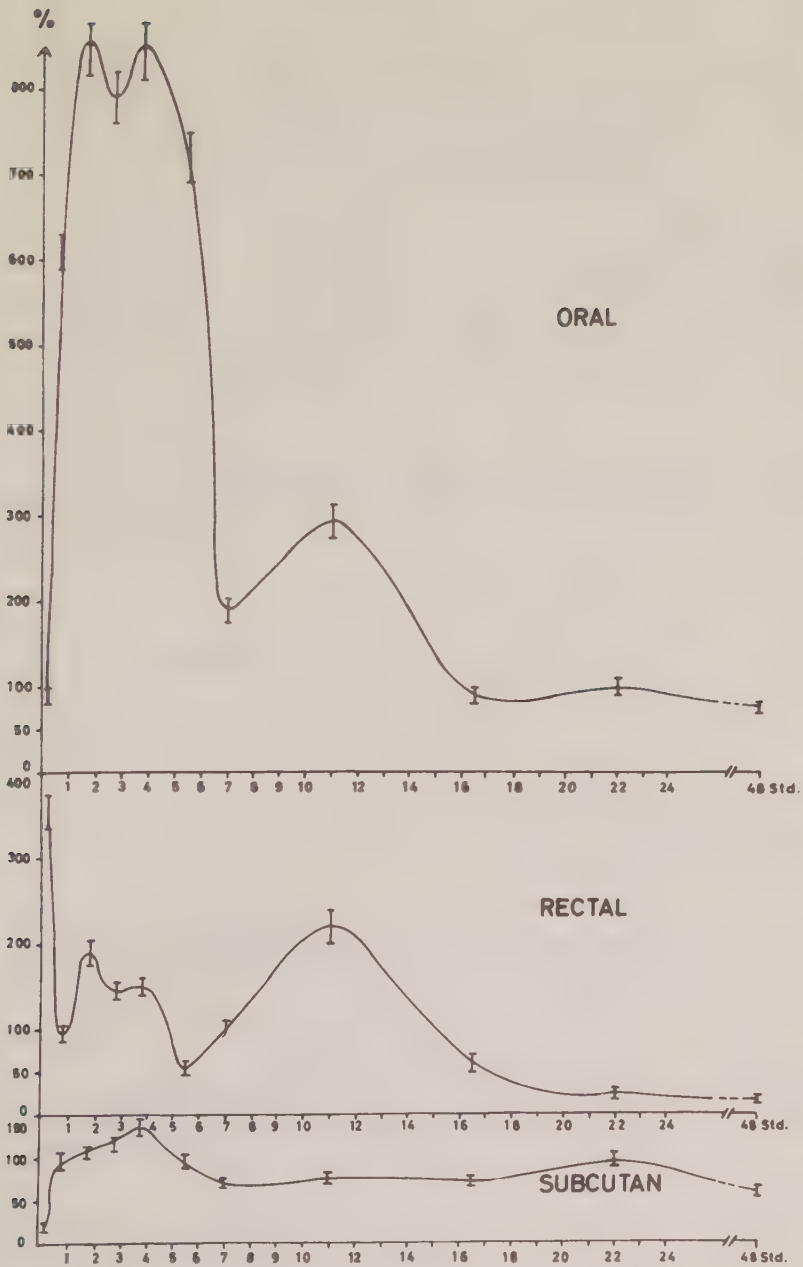


Abbildung 13: Aktivität des Dickdarmes

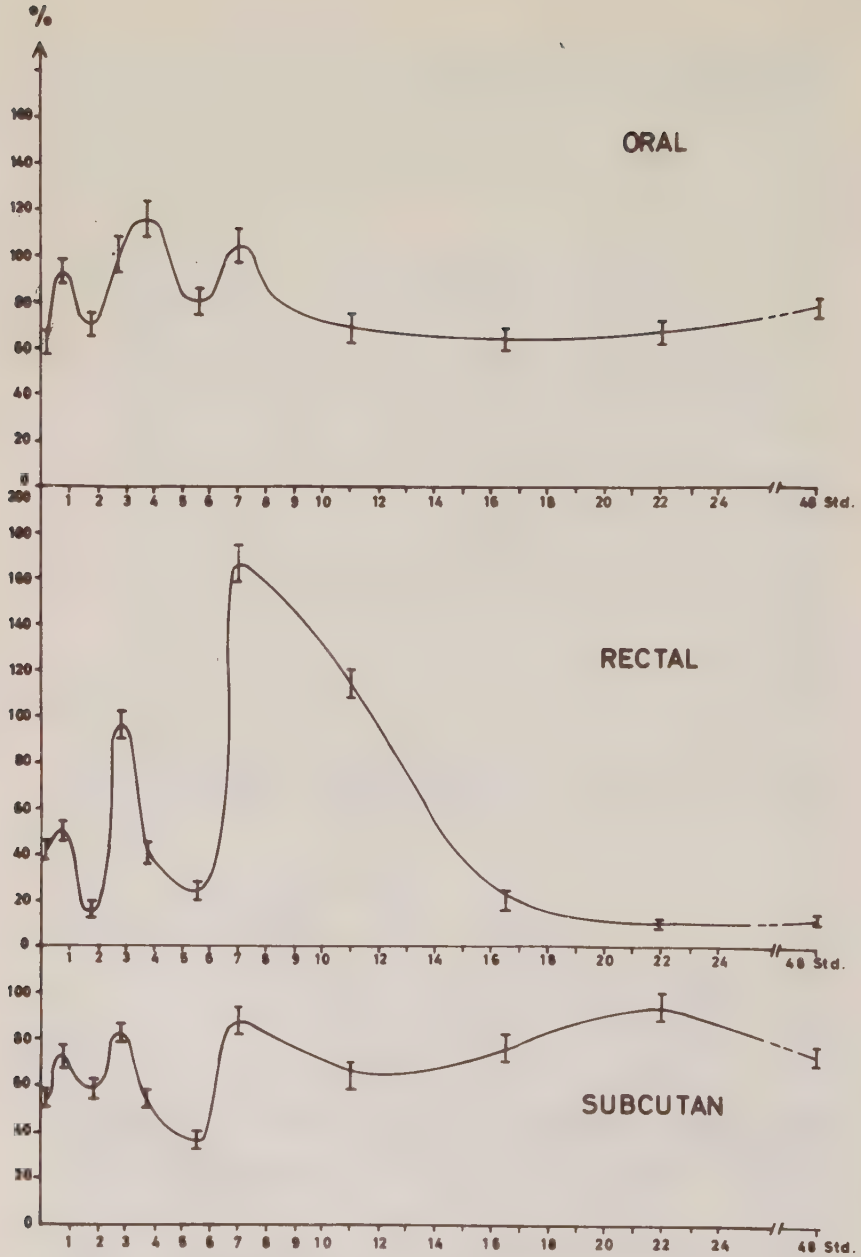


Abbildung 14: Aktivität der Nieren

Gabe ist man zu der Annahme gezwungen,daß die Aktivität, die schon nach wenigen Minuten nachweisbar war,durch hämatogen herangebrachten und schon in das Dünndarmlumen ausgeschiedenen Impfstoff verursacht wurde. Im weiteren Verlauf der Kurve überlagern sich dann diese direkte Ausscheidung und der Weitertransport des Mageninhaltes. Die Kurve nach rectaler Applikation ist entsprechend. In jedem Fall wurde schnell ein Plateau erreicht,doch war nach 16 Std die Aktivität im Wesentlichen wieder ausgeschieden. Das kann,wie schon oben erwähnt wurde,nur mit einer schlechteren und unvollständigen Resorption aus dem Rectum erklärt werden.
Auch die Betrachtung der Kurvenbilder des Dickdarms (Abbildung 13)zeigt,daß nach der oralen Gabe der Anstieg schneller als nach rectaler und subcutaner Applikation erfolgte. Die hohen Werte bei der rectalen Gabe waren durch den eingeführten Impfstoff bedingt. Man muss aber auch beim Dickdarm auf Grund der hohen Werte nach oraler und subcutaner Applikation eine aktive Ausscheidung in das Darmlumen annehmen. Ab 12 Std entsprechen sich Dünndarm und Dickdarm.

Ich halte fest,daß nach allen drei Applikationsarten die Radioaktivität im gesamten Darmrohr schneller anstieg,als nach dem bloßen physiologischen Weitertransport des aktiven Darminhaltes anzunehmen war. Daraus kann man auf eine Sekretion des Impfstoffes in das Darmlumen schließen. Von hier werden Teile sicher wieder resorbiert,ein großer Teil aber gelangt zur Ausscheidung. Das zeigten Stichproben,in denen ich die Aktivität des Kotes untersuchte.

Auch die Nieren (Abbildung 14) zeigten nach oraler und subcutaner Applikation in den ersten Stunden noch stärkere Schwankungen der Aktivität und erst nach 7 Std

ein sicheres Plateau. Die Kurve der rectalen Werte schwankt,wie stets,stärker und sie sinkt auch wieder schneller ab,also zeigt sich auch hier ein Hinweis auf eine geringere Aufnahme aus dem Rectum. In der Dis= kussion wird noch auf weitere mögliche Ursachen dieser Schwankungen eingegangen.
Bei der Untersuchung des Urins fand ich bei Stich= proben sehr oft Radioaktivität,es scheint also auch Impfstoff durch die Nieren ausgeschieden zu werden.

Diskussion

Bei der Bewertung der Kurven ist zu beachten,daß nicht nur die angeführte,technisch bedingte Streuung der Messwerte,sondern auch biologische Schwankungen zu berücksichtigen sind. Diese konnte ich bei meinen Versuchen auf Grund der Zahl der Tiere -ich verarbeitete in den Hauptversuchen 132 Tiere- noch nicht erfassen. Um darüber Aussagen machen zu können,müsste man eine weitaus größere Zahl von Tieren verwenden. Als Beispiel beziehe ich mich hier auf die Werte von UECKER (persönliche Mitteilung),der zur Ermittlung der biologischen Streuung für den 8-Stunden-Wert eine Gruppe von 60 Tieren,die laufend gefüttert wurden,verarbeitete.

Tabelle 3: Standardabweichung der verschiedenen Organe von 60 Mäusen,die mit P-32-markiertem Impfstoff von Salmonella typhi murium oral immunisiert worden waren.

Blut	±	82,9 %	
Leber	±	43,7 %	
Milz	±	35,8 %	
Niere	±	31,6 %	
Mageninhalt	±	120,9 %	(s.Fußnote)
Darm	±	39,0 %	
Lunge	±	30,1 %	
Speicheldrüse	±	41,3 %	

Nach der Tabelle liegen die Schwankungen bei oraler Applikation sehr hoch. Sicher kommen aber in den Einzeltieren,auf die sich die Werte ja beziehen, von Tier zu Tier die Schwankungen stärker zum Ausdruck als bei einer Gruppe,wo ich aus je 12 Tieren einen Mittelwert bildete. Eine echte Verlaufskurve könnte ich nur ermitteln,wenn ich fortlaufend die Aktivität bei Einzeltieren messen könnte. Diese Messung konnte ich aus technischen Gründen nur für die Blutwerte durchführen (Abbildung 4). Die

Fußnote: Die Messwerte für den Mageninhalt haben,wie die berechnete Standardabweichung zeigt, nur beschränkte Aussagekraft,sie sind mehr qualitativ als quantitativ zu bewerten.

Kurve zeigt,daß der Kurvenverlauf im Einzeltier annähernd konstant ist.

Nach meinen Ergebnissen steht also fest,daß ein Teil des Impfstoffes nach jeder der drei Applikationsarten nach kürzester Zeit in das Blut übertritt (Abbildungen 3 und 4). RAETTIG (21) fand,nach oraler Verfütterung von Columbia SK-Virus,daß das Virus nach wenigen Minuten im Blut nachweisbar war,und HOFFMANN (21),der den Mäusen T_3-Phagen verfütterte,konnte diese ebenfalls schon nach 1 Minute aus dem strömenden Blut nachweisen. Mit dieser kurzen Zeit ist aber die alte Ansicht,daß die Bakterien erst im Darm resorbiert werden,nicht zu vereinbaren. Es ist vielmehr zu vermuten,daß der Übertritt ins Blut schon wesentlich früher,im Magen oder schon im Rachen erfolgt. Letzteres hat HOFFMANN für die T_3-Phagen auch tatsächlich nachgewiesen. Nur so ist auch für meine Versuche zu erklären,daß nach der oralen Applikation nur 1 bis 3 Minuten zwischen Verfütterung und erstem Auftreten des Impfstoffes in dem Blut liegen. Für die subcutane Impfung liegen die Verhältnisse naturgegeben klar,und für die Resorption aus dem Darm ist der HERBST-Effekt zu diskutieren.
HERBST hatte schon 1843 gezeigt,daß oral verfütterte Stärkekörner unverändert die Darmschleimhaut passieren und im Ductus thoracicus und im Blut nachgewiesen werden können (15). Dieses Phänomen wurde 1905 von HIRSCH erneut aufgegriffen (16) und 1964 von VOLKHEIMER (17) bestätigt,der es nach dem Entdecker benannte. Bei diesem Effekt sind die Desquamationszonen des Darmepithels der Immigrationsort für die abgetöteten Bakterien. Sie gelangen in das Stroma und über das Lymphgefäßsystem ins Blut.

Bei Betrachtung der Abbildungen 5 und 6,Milz und Leber, findet man ebenfalls schon nach 10 min eine starke Radio-

aktivität dieser Organe. Wenn nun eine Antikörper=
bildung,die zu humoralen Antikörpern führt,erwartet
wird,so ist die Voraussetzung dazu,daß das Antigen
von den Reticuloendothelien aufgenommen wird. Für
meine Versuche heißt das,daß die Radioaktivität in
den Sternzellen der Leberkapillaren und in den Re=
ticulumzellen und Sinusendothelien der Milz lagern
müsste. Zur Stützung dieser Annahme sei auf die Mit=
teilung von ROWLEY,HOWARD und JENKIN (18) verwiesen.
Diese Forscher injizierten weissen Mäusen P-32-mar=
kierte Lipopolysaccharide aus Bakterien intravenös
und fanden,daß schon nach 8 min 60 bis 75 % der Radio=
aktivität aus dem strömenden Blut eliminiert und haupt=
sächlich in den RES-Anteilen von Milz und Leber ge=
speichert waren. Das wiesen sie mit Hilfe der Histo=
autoradiographie nach. Auch nach meinen Ergebnissen
kann ich vermuten,daß das Antigen im RES gespeichert
wurde. Die Autoradiographie würde weiteren Aufschluß
bringen.
Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von ROWLEY und
Mitarbeitern,die nach 8 min den Großteil des Antigen
aus dem Blut eliminiert fanden und meinen Daten,wonach
sich das Antigen noch sehr lange im Blut hält,liegt
in der verabfolgten Menge begründet. ROWLEY und Mit=
arbeiter gaben den Tieren Mengen von 60 µg und sie
fanden nach einer Zweitinjektion nach 30 min eine viel
langsamere Elimination aus dem Blut. Dies erklären sie
damit,daß bei der ersten Injektion das RES bereits
durch den Impfstoff blockiert worden war. Ich gab den
Tieren etwa 300 µg,wodurch also,bei der nachgewiesenen
Resorption nach allen drei Applikationsarten,schon nach
einer einzigen Impfstoffgabe das RES blockiert ist.
Die Amplitudenschwankungen in den Kurven von Milz und
Leber kann ich einmal dadurch erklären,daß die Organe

stets in blutgefülltem Zustand untersucht wurden, wodurch sich die Schwankungen,die der Blutspiegel zeigt,auf diese Organe aufpfropften,zum anderen sind sie aber sicher auch durch die biologische Streuung bedingt.
Die Abbildung 7 zeigt,daß ich nach allen drei Applikationsarten sehr hohe Werte im Mageninhalt fand.
Wie gelangt das Antigen nun in den Magen?

Die Fähigkeit der Speicheldrüsen des Mund- und Rachenraumes,auch als Ausscheidungsorgan zu wirken,ist bekannt. So kommt es z.B. bei Nierenerkrankungen zur Exkretion von Harnstoff,Harnsäure,Kreatinin und Aminosäuren durch die Drüsen der Mundhöhle. Auch parenteral zugeführte Vitalfarbstoffe (Indigokarmin) werden in das Drüsenlumen ausgeschieden (BARGMANN,19),und GABL (23) wies elektrophoretisch Serumproteine im Speichel nach. Andererseits könnten hier auch die Drüsen des lymphatischen Rachenringes als Ausscheidungsorgane wirken. Dazu sei auf die Untersuchungen von EIGLER (24) verwiesen,der erwähnt,daß beim Menschen die Erreger von Scharlach,Masern,Rotlauf, Bauchtyphus und Kuhpocken auf und in den Tonsillen nachgewiesen werden können,was auf die Möglichkeit hindeutet,daß hier die Mikroorganismen ausgeschieden werden können. Warum sollte nicht auch radiomarkiertes Antigen,wenn es einmal die Blutbahn erreicht hat,auf einem dieser Wege ausgeschieden werden? Meine Versuchsergebnisse (Abbildung 9) lassen es für die Speicheldrüsen vermuten.
Als Kontrolle zu diesen Versuchsergebnissen untersuchte ich Speichel,der gewonnen wurde,indem ich die Tiere mehrfach direkt auf Saugpapierplättchen,mit denen der Probenwechsler dann beschickt wurde,beissen ließ. Wegen der Unmöglichkeit,die dabei erhaltenen Werte quantitativ miteinander zu vergleichen,gebe ich

hier nur eine Tabelle,in der die absoluten Messwerte eingetragen sind,wieder.

Applikation	10 min →	45	1 3/4 Std. →	2 3/4	3 3/4	5 1/2	7	22	48	
ORAL	70	31	2	7	24	5	0	0	2	Imp/min
RECTAL	8	53	10	8	13	6	0	17	0	"
SUBCUTAN	5	45	7	9	10	3	0	2	9	"

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen,daß nach allen drei Applikationsarten Radioaktivität,die ich ja mit dem Antigen gleichsetze,im Speichel nachweisbar war. Die Unterschiedlichkeit der Werte erklärt sich aus der unterschiedlichen Menge des gewonnenen Speichels.

Aus dem Vergleich der Abbildungen 3 und 9,aus denen hervorgeht,daß die Werte der Gl.submandibularis stets über den Blutwerten liegen,muss man schließen,daß das Antigen wirklich in das Parenchym der Drüse übergegangen ist.
Das Antigen könnte also von den Speicheldrüsen sezerniert und,wie die Untersuchung des Oesophagus (Abbildung 8) zeigt,verschluckt und in den Magen gelangt sein. Ein anderer Teil könnte über den oben beschriebenen Weg im Rachen wieder resorbiert worden sein.
Der zweite Weg,auf dem das Antigen in den Rachen und Oesophagus gelangt sein kann,ist der über den Respirationstrakt. Wie die Untersuchung der Lungen (Abbildung 10) zeigt,fand ich dort eine starke Anhäufung von Radioaktivität. Auch ROWLEY und Mitarbeiter fanden nach Gabe von Lipopolysacchariden in der Lunge Aktivität. Jedoch lagen die Werte bei ihnen sehr viel niedriger,da ja die Hauptmasse des Impfstoffes vom RES weggefangen war. Als Hinweis zu der Frage,ob das von mir in der Lunge gefundene

Antigen tatsächlich von der Blutbahn oder den Lymph=spalten aus über die Deckzellen in die Alveolarlichtun=gen ausgeschieden werden kann,sei an folgende Tatsache erinnert: Die Deckzellen der Alveolen stellen "reakti=onsbereite Elemente der Abwehr an einem als Einbruchs=stelle praedisponierten Organ dar" (BARGMANN). Die Deckzellen können phagozytieren (Staub,Ruß,Staphylo=kokken,Tuberkelbakterien);stark beladene Zellen treten in die Alveolarlichtung über und werden ausgehustet. Umgekehrt können die Alveolarepithelien auch auf dem Blutwege herangeführte Stoffe (Cholesterin,Fett) spei=chern. Wegen dieser Fähigkeit rechnen manche Forscher (POLICARD) diese Zellauskleidung der Alveolen sogar zum RES im weiteren Sinne,d.h.als mesenchymaler Schutz=apparat der Lunge (BARGMANN,19). Es erscheint also durchaus möglich,daß das Antigen auch auf diesem Wege ausgeschieden werden kann.

Eine zweite Möglichkeit im Respirationstrakt sind die in den letzten Verzweigungen der Bronchiolen liegenden granulierten Epithelzellen,deren eigentliche Funktion noch unklar ist. Sie sondern ein flüssiges Sekret von unbekannter Natur in Form von Kuppen oder Tropfen ab, und zwar nach dem Modus der apokrinen Sekretion. Das zeigte CLARA (20) im Jahre 1937.

Als dritte Möglichkeit kommt der Bronchialbaum nebst Trachea in Frage (Abbildung 11). Hier findet einmal in den schleimproduzierenden Becherzellen ständig eine Sekretion statt,und zum anderen in den seromukösen Schleimdrüsen,die in der Trachea und den Bronchien gefunden werden und die den Mundspeicheldrüsen ähn=lich gebaut sind.

Die nachgewiesene Radioaktivität im Respirationstrakt muss auf einem der angeführten Wege sezerniert werden. Welcher es ist,kann nur mit Hilfe der Histoautoradio=

graphie eindeutig entschieden werden.
Den Transport in den Rachen besorgt dann das Flimmer=epithel,das auch bei der Maus Bronchien und Trachea auskleidet.

Der dritte Weg,auf dem das Antigen in den Magen ge=langen kann,ist der über die Magenschleimhaut. Hier müssen beim Menschen auch die Fundus- und Cardia=drüsen,deren Funktion noch nicht genau bekannt ist (19),in Betracht gezogen werden.
Auf einem oder auch mehreren der angeführten Wege gelangt das Antigen sicher in den Mageninhalt. Dort wird es mit dem Chymus vermengt und gespeichert und ergibt so die gefundenen sehr hohen Werte.
Die Schwankungen in der Kurve des Mageninhaltes könnten dann mit durch eine Überlagerung der ver=schiedenen Sekretionsmechanismen bedingt sein.
Für das Einzeltier könnte man,wenn man in der Lage wäre,den Mageninhalt kontinuierlich zu messen, die durch die Schwankungen in Sekretion und Resorption bedingten Schwankungen der Kurven erfassen;bei einer genügend grossen Tiergruppe werden derartige Schwan=kungen aber statistisch ausgeglichen.

Vom Magen gelangt das Antigen in den Dünndarm,wo man wieder zwei Mechanismen,nämlich wieder Resorption und Sekretion,annehmen muss.
Die Resorption des Antigen aus dem Darm ist bekannt Daß sie auch in Colon und Rectum stattfindet,zeigt der Nachweis von Antigen im Blut nach der rectalen Applikation. Für den Dünndarm berichtete PASQUIER (22) über ähnliche Ergebnisse nach oraler Gabe von TAB-Impfstoff,der mit C-14 radiomarkiert war. Er zeigte mit Hilfe der Histoautoradiographie,daß der TAB-Impfstoff die Intestinalschleimhaut passiert und in den Mesenteriallymphknoten,der Milz und zu einem

geringen Teil auch in der Leber gespeichert wird.

Zur Frage der Sekretion ist nach den Untersuchungen von BARANDUN et al. (23) sicher,daß unter physiologischen Bedingungen zumindest Albumin und Gammaglobulin in nicht unbeträchtlicher Menge aus der Blutbahn in das Darmlumen übertreten. Bei der Maus wurde neben diesem Übertritt von Plasmaproteinen auch noch ein Übertritt von Lipiden gefunden. BARANDUN et alii wiesen diesen Übertritt für den Magen,das Jejunum und das Ileum nach. Ob hierbei der Schleim,der von den Darmdrüsen gebildet wird,als Träger wirkt, oder ob eine direkte Sekretion aus den Blutgefässen stattfindet,ist noch unklar.
Für das Antigen schließe ich auf eine Sekretion in das Darmlumen aus der Tatsache,daß auch nach subcutaner Applikation die Dünndarm- und Colonwerte schon nach kurzer Zeit so hoch waren,daß das Antigen nur auf dem Blutweg an den Darm herangebracht und in das Lumen sezerniert werden konnte. Der Schleim,der von den Darmdrüsen sezerniert wird,bietet sich hierbei als Träger an,genau so gut ist eine direkte Sekretion aus den Blutgefässen möglich. Für die wichtige Rolle des Darmes für das Schicksal des Antigen sprechen auch die ins Auge fallenden sehr hohen Werte nach oraler Applikation. Hier sind die Colon-Werte nach kurzer Zeit so hoch,daß das Antigen bereits kurz nach der Verfütterung resorbiert und wieder sezerniert worden sein muss. Das wiederum spricht für eine Resorption in den Anfangsteilen des Verdauungstraktes. Ein Teil der Aktivität im Darm rührt aber sicher auch von den großen Verdauungsdrüsen her.
Die Rolle der Niere endlich ist unklar. Ich fand hier relativ hohe Antigenmengen,auch nach Abzug der Blutwerte. Es ist bekannt,daß sich bestimmte Epithelien der

Niere speicherungsbereit zeigen,wenn der Farbstoff auf dem Blutweg bzw. im Primärharn angeboten wurde. Bei der Maus ist wie bei der Ratte eine physiologische Eiweißdurchlässigkeit der Glomerula bekannt, so daß das Antigen im Primärharn angeboten werden konnte. Doch beim Menschen liegen die Verhältnisse anders,so daß diese Ergebnisse (Abbildung 14) nicht ohne Weiteres übertragen werden können,es ist jedoch sicher,daß der Organismus bei einem Überangebot Aminosäuren durch die Nieren ausscheidet. Aus meinen Ergebnissen kann ich nur schließen,daß bei den Versuchstieren Antigen gespeichert,aber auch mit dem Harn ausgeschieden worden ist.

Wenn ich nun meine Überlegungen zusammenfasse,so lässt sich folgende Arbeitshypothese entwickeln: Oral zugeführtes Antigen wird schon im Rachenraum,spätestens aber im Magen und Darm resorbiert und in die Blutbahn gebracht. Für die subcutane Applikation sind die Verhältnisse klar und für die Aufnahme des rectal gegebenen Materials muss man eine Resorption im Sinne eines HERBST-Effektes annehmen.
Aus der Blutbahn wird der Impfstoff gleichzeitig wieder eliminiert. Das geschieht,indem ein Teil im RES gespeichert wird,ein Teil wird über die Nieren ausgeschieden und ein dritter,wahrscheinlich der grösste Teil,wird über die Speicheldrüsen und eventuell die Drüsen des lymphatischen Rachenringes,Drüsen und Zellen im Respirationstrakt oder Magen- und Darm-Drüsen wieder in den Magen-Darm-Kanal befördert. Von hier wird er dann wieder zum Teil in die Blutbahn gebracht,zum Teil ausgeschieden. Zwar wird die Vielzahl der Stationen,die der Impfstoff passiert und wo er resorbiert,sezerniert und eliminiert wird,beim Einzeltier gewisse Schwankungen der Aktivität ergeben,doch sind bei Tiergruppen hierauf

zurückzuführende Schwankungen grundsätzlich nicht zu erfassen. Wie lange dieser,mit ständig abnehmender Antigenmenge ablaufende Kreislauf anhält,lässt sich nach meinen Versuchen nicht beantworten,aber es ist sicher,daß die Zeit genügt,um jede Zelle,die Bindungsvermögen für das Antigen besitzt,mit ihm in Kontakt zu bringen.

Wie in der Einleitung gesagt worden ist,besteht in der älteren Literatur eine Diskrepanz zwischen zwei Schulen, und zwar der,die eine humorale und der,die eine lokale Immunität forderte. Nach den Ergebnissen meiner Versuche ist es für die praktische Durchführung der Typhusschutzimpfung bedeutungslos,wo das Antigen zuerst mit dem Körper in Berührung kommt. Danach ist sowohl der Modus der Antikörperbildung durch Plasmazellen,die über das Blut und das RES mit dem Antigen versorgt werden,als auch der Modus der Bildung einer vorwiegend lokalen Magen-Darm-Immunität möglich. Dabei ist noch nicht geklärt,ob zelluläre Reaktionen in der Darmwand,Bildung von Coproantikörpern oder ähnliche Mechanismen entscheidend beteiligt sind.

Auf jeden Fall bietet die orale Applikation bei der Typhusschutzimpfung so viele Vorteile (3),denen keine entscheidenden Nachteile gegenüberstehen,daß sie stärker in den Vordergrund gerückt werden sollte.

Zusammenfassung

Ich markierte Salmonella typhi murium-Vollantigen mit dem Radionuklid P-32, inaktivierte es durch Hitze und gab diesen Impfstoff weissen Mäusen oral, rectal und subcutan. Dann wurden nach Zeiten zwischen 10 min und 48 Std die inneren Organe entnommen,mit Kalilauge lysiert und unter dem Geiger-Müller Endfensterzählrohr einzeln auf ihren Impfstoffgehalt untersucht.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß nach oraler und rectaler genau wie nach subcutaner Applikation der Übertritt des Impfstoffes ins Blut schon nach sehr kurzer Zeit erfolgt. Also ist auch beim Mäusetyphus die Möglichkeit einer Bildung humoraler Antikörper gegeben. Dafür spricht auch die Anhäufung von Impfstoff in Leber und Milz. Ebenso ist aber auch die Bildung einer vorwiegend lokalen Immunität des Darmes möglich,da auch nach rectaler und subcutaner Gabe der Impfstoff nach kurzer Zeit im Magen und Darm nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung ist neu,sie wird gesichert durch die Tatsache,daß es möglich war, kurze Zeit nach rectaler Applikation des Impfstoffes das Antigen wieder aus dem Mageninhalt zu gewinnen. Mit diesem Antigen konnte ich bei Kaninchen eine Bildung von spezifischen Antikörpern induzieren.

Man muss danach einen Kreislauf des Impfstoffes im Organismus annehmen,zu dessen Stationen die Mundspeicheldrüsen und eventuell die Drüsen des lymphatischen Rachenringes,die Rachenschleimhaut,die Lunge und sezernierende Zellen und Drüsen des Respirationstraktes gehören sowie Schleimhaut und Drüsen in Magen und Darm. Die Transportwege sind das Blut- und Lymphgefäßsystem. Auf diese Weise ist sichergestellt, daß

jede Zelle des Körpers, die mit dem Antigen zu reagieren vermag,mit diesem in Berührung gebracht werden kann.

Bei Übertragung der Versuchsergebnisse auf den Menschen ist also die orale Gabe des Impfstoffes bei der aktiven Schutzimpfung gegen bakterielle Darmerkrankungen grund= sätzlich berechtigt.

Schrifttum

1 Ehrlich,P.: Experimentelle Untersuchungen über Immunität. Dtsch.med.Wschr.1891 976 und 1218

2 Loeffler,F.: Über Immunisierung per os. V.Leuthold Gedenkschrift I,247 (1906)

3 Raettig,H.: Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus,Paratyphus,Cholera,Ruhr). Zbl.f.Bakt.I Ref. 183,427-480 (1961)

4 Raettig,H.: Tierexperimente zur oralen Immunisierung mit inaktiviertem Antigen. Zbl.f.Bakt. I.Orig. 182,525 (1961)

5 Engelhardt,H.: Experimentelle Beiträge zur oralen Typhusimmunisierung. Zschr.f.Immunitätsforschg.121, 437 (1961)

6 Besredka,A.: Die lokale Immunisierung. Naturwissenschaften 15,395 (1927)

7 v.Wassermann und Citron,J.: Über die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Zschr.f.Hyg. 50, 331 (1905)

8 Brückner,G.: Über orale Immunisierungsversuche. Zschr.f.Immunforschg. 8,439 (1911)

9 Lumière,A.: La typho-vaccination par voie intestinale est-elle possible? Press.med. 23 (1915)

10 Chevrotier,J.: Sur la vaccination antityphique par

voie gastrointestinale. Compt.rend.Acad.Scienc. 158,197 (1914)

11 Reiter,H.: Versuche über perorale Immunisierung. Dtsch.med.Wschr.946 (1926)

12 Ehrich,A.: Morphologie und Physiologie der Antikörperbildung. Verh.Deutsche Ges.Path. 46,10-48 (1962)

13 Haurowitz,F.: Die Art und Bildung von Antikörpern. Zbl.f.Bakt. Orig. 184,318-23 (1962)

14 Guelin,A. und Lepin,P.: Verteilung von radioaktivem Phosphor in hitzeinaktivierten Bakterien. Ann.Inst.Pasteur 101,677-86 (1961)

15 Herbst,G.: Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen. Göttingen 1844. S.333

16 Hirsch,R.: Zschr.exper.Path. 3,390 (1906)

17 Volkheimer,G.: Zschr.f.Gastroenterologie 2,57 (1964)

18 Rowley,Howard and Jenkin,J.: The fate of P-32-labelled Lipopolysaccharide in laboratory animals. The Lancet April 1956,366 (1956)

19 Bargmann,W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Thieme,Stuttgart 1959

20 Clara,M.: Zur Histobiologie des Bronchialepithels. Zschr.f.mikroskop.-anatom.Forschg.41 (1937)

21 Raettig,H.: Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung. Nach einem am 10.9.1964 auf der 9.Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene gehaltenen Referat.

22 Pasquier,J-F.: Étude,chez la souris,de la Distribution et de l'Elimination des Bacilles Typhiques et Paratyphiques A et B tués,marqués au carbonne 14,administres par ingestion. Ann. Inst.Pasteur 109,449 (1965)

23 Barandun,Nussle,Witschi,Buser : Untersuchungen über den Durchtritt von Plasmaproteinen in das Darmlumen bei Kindern. Schweizer Med.Wschr.92, 353-6 24.März 1962

24 Eigler,G.: Was wissen wir über die Infektionsabwehr des lymphatischen Rachenringes? Med. Klin. 60,1265-8 (1965)

Zum Schluß danke ich dem Robert Koch-Institut Berlin für die Möglichkeit der tierexperimentellen Untersuchungen, Herrn Prof.Dr.med. H.Raettig für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung während der Arbeit, und Herrn Dr. Uecker,Leiter des Isotopenlaboratoriums im Robert Koch-Institut,für die hilfreiche Anleitung bei der Arbeit mit Radionukliden.

Lebenslauf

Am 18.Juni 1938 wurde ich als zweiter Sohn des Dr.med.Fritz Meves und seiner Frau Katharina in Dortmund geboren.
Die Kriegsjahre verbrachte ich mit der Familie in Torgau/Sachsen und in Tübingen. Von 1947 bis 1959 lebte ich in Stuttgart. Dort besuchte ich das humanistische Eberhard Ludwigs-Gymnasium,das ich Ostern 1959 mit dem Reifezeugnis verließ.
Das Studium der Medizin begann ich in Kiel. Nachdem ich dort das Vorphysikum abgelegt hatte,wechselte ich an die Universität des Saarlandes in Saarbrücken über,wo ich mit dem Physikum abschloß. Anschließend studierte ich ein Semester in München,ehe ich mich im Winter 1962 endgültig in Berlin niederließ. Hier bestand ich im September 1965 das medizinische Staatsexamen.
Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent an der I.inneren Abteilung des städt.Krankenhauses Moabit.